

修 士 論 文 の 和 文 要 旨

研究科・専攻	大学院 電気通信学研究科 量子・物質工学専攻 博士前期課程		
氏 名	今井 修	学籍番号	0933007
論 文 題 目	細胞小器官による細胞内イオン濃度の調節機構に関する研究		

【背景・目的】

哺乳類では受精時に細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) の周期的な増減 (Ca^{2+} オシレーション) が起こる。これは精子からの刺激が引き金となり、細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体から Ca^{2+} が遊離されることによる。一方で、ミトコンドリアへの Ca^{2+} の取り込みや遊離が、ある種の細胞での Ca^{2+} 動態の制御に寄与していることも示唆されている。本研究ではマウス受精卵での Ca^{2+} オシレーションの発生・維持に対するミトコンドリアの関与を検証するため、 Ca^{2+} 感受性蛍光プローブを用いて受精卵のミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$) の変化の測定を試みた。また、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入の駆動力であるミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$) についても解析を行った。

【実験方法】

1. マウス受精卵での $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ と $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の同時測定

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ 測定用の Ca^{2+} プローブには rhod-2 を用いた。膜透過型誘導体である rhod-2 AM を予め NaBH_4 で還元した後、マウス成熟卵にロードした。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の測定には fura-2 を用いた。rhod-2 と fura-2 の両方をロードした卵について、受精時のそれぞれの蛍光シグナルを励起 560 nm / 蛍光 610 nm および励起 380 nm / 蛍光 510 nm で経時的に測定した。

2. マウス受精卵での $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ と $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の同時測定

$\Delta\Psi_{\text{mit}}$ の測定には teramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) を用いた。TMRE は $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ に依存してミトコンドリアに蓄積するため、 $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ 変化は TMRE 蛍光強度変化として測定できる。fura-2 をロードしたマウス卵を 0.2 nM TMRE を含む培地中におき、培精後、励起 560 nm / 蛍光 610 nm で TMRE シグナルを、励起 380 nm / 蛍光 510 nm で fura-2 シグナルを、それぞれ経時的に測定した。

【結果・考察】

rhod-2 はミトコンドリアに蓄積しやすい性質を持つため一般的に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の測定に用いられるが、通常の方法でロードした卵細胞から得られる蛍光シグナルには、細胞質に残存する rhod-2 由来の成分が有意に含まれていた。予め rhod-2 を無蛍光である dihydrorhod-2 に還元してから卵細胞にロードすると、ミトコンドリア内に取り込まれたものだけが酸化されて蛍光性を回復するため、より特異的に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を反映した蛍光シグナルを得ることができた。

受精卵での $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ と $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の同時測定では、最初の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇時に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ も急激に大きく上昇することが観察された。以後 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ はオシレーションを示したのに対し、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ は静止時より高いレベルで維持されていたことから、 Ca^{2+} オシレーション中にはミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入が促進されていることが示唆された。

一方、TMRE を用いた受精卵での測定では $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ に有意な変化は検出されなかった。従って、受精時の Ca^{2+} オシレーション中にみられるミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入の促進は、 Ca^{2+} の受動輸送に対する駆動力の変化ではなく、ミトコンドリア内膜に存在する Ca^{2+} 能動輸送系（例えば $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送体など）に対する調節作用の結果である可能性が高いと考えられる。